

稻纵卷叶螟肠道细菌群落结构与多样性分析

刘小改^{1,2}, 杨亚军², 廖秋菊¹, 徐红星², 刘映红^{1,*}, 吕仲贤^{2,*}

(1. 西南大学植物保护学院, 重庆 400716; 2. 浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所,

浙江省植物有害生物防控重点实验室省部共建国家重点实验室培育基地, 杭州 310021)

摘要:【目的】为明确水稻主要害虫稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) 幼虫肠道细菌的群落结构和多样性。【方法】利用 Illumina MiSeq 技术对稻纵卷叶螟 4 龄幼虫肠道细菌的 16S rDNA V3-V4 变异区序列进行测序, 应用 USEARCH 和 QIIME 软件整理和统计样品序列数和操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 数量, 分析 4 龄幼虫肠道细菌的物种组成、丰度和多样性。【结果】稻纵卷叶螟 4 个数量不同的 4 龄幼虫样本 (1, 2, 3 和 5 头) 共得 165 386 条 reads, 在 97% 相似度下可将其聚类为 604 个 OTUs。总共注释到 22 个门, 43 个纲, 82 个目, 142 个科, 204 个属, 244 个种。其中在门水平上, 主要优势菌为变形菌门 (Proteobacteria) (相对丰度 26%~34%) 和放线菌门 (Actinobacteria) (23%~32%); 在纲水平上, 主要优势菌为放线菌纲 (Actinobacteria) (相对丰度 23%~32%)、酸杆菌纲 (Acidobacteria) (9%~11%)、 α -变形菌纲 (Alphaproteobacteria) (10%~13%)、 β -变形菌纲 (Betaproteobacteria) (6%~8%) 和 γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria) (6%~12%); 在科水平上, 共有优势菌为类诺卡氏菌科 (Nocardiodiaceae)、丛毛单胞菌科 (Comamonadaceae)、黄单胞菌科 (Xanthomonadaceae)、鞘脂单胞菌科 (Sphingomonadaceae) 和芽单胞菌科 (Gemmatimonadaceae) 等。在属水平上, 4 个样本前 5 位优势属中, 类诺卡氏属 *Nocardioides* 和鞘脂单胞菌 *Sphingomonas* 为共有优势属。稻纵卷叶螟肠道细菌 Simpson 指数、Shannon 指数、Ace 指数和 Chao 指数分别为 0.16~0.65, 0.94~3.22, 212~488 和 210~490。【结论】稻纵卷叶螟幼虫肠道细菌多样性比较丰富, 个体间微生物群落结构和多样性有差异。不同数量样本数据与总体数据有助于综合反映稻纵卷叶螟种群肠道微生物状况。本研究结果为进一步研究稻纵卷叶螟肠道微生物的功能及其在防治中的应用奠定了基础。

关键词: 稻纵卷叶螟; 肠道细菌; 多样性; 16S rDNA; 基因测序

中图分类号: Q965.8 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2016)09-0965-12

Analysis of the bacterial community structure and diversity in the intestine of *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae)

LIU Xiao-Gai^{1,2}, YANG Ya-Jun², LIAO Qiu-Ju¹, XU Hong-Xing², LIU Ying-Hong^{1,*}, LU Zhong-Xian^{2,*} (1. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing, 400716, China; 2. State Key Laboratory Breeding Base for Zhejiang Sustainable Pest and Disease Control, Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: 【Aim】To clarify the community structure and diversity of bacteria in the intestine of *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) larvae. 【Methods】The V3-V4 regions of the 16S rDNA genes of intestinal bacteria in the 4th instar larvae of *C. medinalis* were sequenced by Illumina MiSeq techniques. The numbers of sequences and operational taxonomic units (OTUs), species composition, abundance and

基金项目: 国家水稻产业技术体系 (CARS-01-17); 国家自然科学基金项目 (31501669); 浙江省重点研发项目 (2015C02014)

作者简介: 刘小改, 女, 1990 年 11 月生, 河南郑州人, 硕士研究生, 研究方向为水稻害虫的发生与防治, E-mail: xiaogai_liu@163.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: yhliu@swu.edu.cn; luzxmh2004@aliyun.com

收稿日期 Received: 2016-06-24; 接受日期 Accepted: 2016-08-20

diversity of the bacteria were analyzed using USEARCH and QIIME softwares. A total of 165 386 reads were obtained in the four samples consisting of 1, 2, 3 and 5 larvae of *C. medinalis*, respectively. 【Results】 After filtration, 604 OTUs were acquired and annotated into 22 phyla, 43 classes, 82 orders, 142 families, 204 genera, and 244 species. Common dominant bacteria based on phyla were Proteobacteria (relative abundance 26% – 34%) and Actinobacteria (23% – 32%). Actinobacteria (relative abundance 23% – 32%), Acidobacteria (9% – 11%), Alphaproteobacteria (10% – 13%), Betaproteobacteria (6% – 8%), Gammaproteobacteria (6% – 12%) were dominant at the class level. Nocardiodaceae, Comamonadaceae, Xanthomonadaceae, Sphingomonadaceae, and Gemmatimonadaceae were commonly dominated at the family level in the bacterial communities from the four samples, and *Nocardioidea* and *Sphingomonas* were the commonly dominated genera in the top 5 genera of bacterial communities from the four samples. The indices of Simpson, Shannon, Ace and Chao were 0.16 – 0.65, 0.94 – 3.22, 212 – 488 and 210 – 490, respectively. 【Conclusion】 The results indicate that there are diverse bacteria in the intestine of *C. medinalis* larvae, and there are differences in bacterial structure and diversity among intestines of *C. medinalis* individuals. The information from samples of different size and the total sample can promote the comprehensive understanding of the bacterial community in the intestine of *C. medinalis* population. The information of bacterial abundance and diversity in the intestine of *C. medinalis* will facilitate the studies on the new technology of its control based on the intestinal bacteria.

Key words: *Cnaphalocrocis medinalis*; intestine bacteria; diversity; 16S rDNA; gene sequencing

昆虫肠道是一个重要的器官,由于肠道的特殊生态环境,其中栖息着大量的微生物。在长期进化过程中,昆虫与肠道微生物相互合作、相互影响、协同进化,形成了不可分割的共生关系(相辉和黄永平, 2008)。肠道微生物的群落结构、代谢活动受到宿主昆虫肠道微环境的影响,微生物通过一系列策略适应昆虫肠道微环境(Douglas, 2015)。另一方面,由于肠道微生物与寄主昆虫之间长期的进化关系,肠道微生物在寄主昆虫的生命活动中起着至关重要的作用(相辉和黄永平, 2008; Engel and Moran, 2013)。肠道微生物参与食物消化、提供特殊营养、抵抗外来微生物侵染、降解食物中有毒物质、合成信息素成分和引起宿主昆虫免疫反应等(Boman and Hultmark, 1987; Dillon *et al.*, 2002, 2005; Warnecke *et al.*, 2007; Broderick *et al.*, 2009; Douglas, 2009)。目前,昆虫肠道微生物研究已经在家蚕 *Bombyx mori*、贡嘎蝠蛾 *Hepialus gonggaensis*、舞毒蛾 *Lymantria dispar*、沙漠蝗 *Schistocerca gregaria*、黄胸散白蚁 *Reticulitermes speratus* 和西方蜜蜂 *Apis mellifera* 等多种昆虫中开展,并取得了一定进展(Dillon *et al.*, 2002; Broderick *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2008; Martinson *et al.*, 2012; Engel *et al.*, 2012; 周洪英等, 2015)。

最初,昆虫肠道微生物的研究主要依靠传统的分离培养手段,然而由于人们认知条件的限制,昆虫

肠道微生物的研究仅局限于少量可培养微生物,大多数微生物尚难被分离培养,这也极大地限制了昆虫肠道微生物研究。随着技术发展,DGGE 技术应用到昆虫肠道微生物研究中,拓展了昆虫肠道微生物研究的种类与范围,促进了昆虫肠道微生物的研究水平(Dillon and Dillon, 2004)。近年来,随着测序技术和分子生物信息技术的迅速发展,大量的分子生物学技术应用于肠道微生物研究中,这些方法具有快速、全面、方便等优点(Reeson *et al.*, 2003)。16S rDNA 基因文库技术和 Illumina MiSeq 测序技术等代表性新技术的应用极大地促进了昆虫肠道微生物领域的研究(Hammer *et al.*, 2014; Itoh *et al.*, 2014)。

稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) 属鳞翅目(Lepidoptera) 螟蛾科(Pyrilidae), 是一种危害水稻的重要迁飞性害虫(张孝羲等, 1980b)。该虫以幼虫吐丝粘连叶片边缘致水稻叶片纵卷成苞,在卷苞内刮食叶肉组织危害,使水稻叶片形成白色条斑,严重时全叶枯白,影响叶片光合作用,导致水稻粒粒增加、千粒重下降,造成严重的经济损失(张孝羲等, 1980a; 陈永年, 1985; 李传明等, 2011)。目前,国内外对稻纵卷叶螟的研究主要集中在生物学、生理学、生态学和化学防治等方面(Nathan *et al.*, 2007; Punithavalli *et al.*, 2013; 张帅等, 2014; 杨亚军等, 2015)。鉴于肠道微生物的功

能,有必要对稻纵卷叶螟肠道微生物开展研究。杨焯(2012)利用传统的细菌分离培养技术获得稻纵卷叶螟肠道微生物 25 个种,15 个属。但由于当时分离培养技术的局限而未能对稻纵卷叶螟肠道微生物的群落结构和多样性进行分析。进一步开展稻纵卷叶螟肠道微生物的研究将有利于深入探讨肠道微生物与昆虫共生的进化意义,而分析其肠道微生物功能则有助于寻找稻纵卷叶螟防治的新线索。为此,本研究采用 16S rDNA 基因文库技术和 Illumina MiSeq 测序技术检测了稻纵卷叶螟 4 龄幼虫的肠道微生物,并分析其群落结构,以期为进一步探讨稻纵卷叶螟肠道微生物功能及其生物防治提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

2015 年 7 月在浙江省杭州市郊区水稻田采集稻纵卷叶螟幼虫,在室温 $26 \pm 2^\circ\text{C}$,相对湿度 $85\% \pm 5\%$,光周期 16L:8D 条件下用水稻苗饲养。选取饲养获得的稻纵卷叶螟 4 龄幼虫作为供试昆虫。

1.2 稻纵卷叶螟肠道分离及肠道细菌总 DNA 提取

取稻纵卷叶螟 4 龄幼虫,用 75% 酒精溶液将稻纵卷叶螟 4 龄幼虫体表消毒,无菌操作条件下解剖肠道,仔细取出完整肠道后清除肠道内含物,在无菌水中缓慢清洗后放入灭菌的 2 mL 离心管中, -20°C 下保存以备用于 DNA 提取。使用 E. Z. N. A.® 细菌 DNA 提取试剂盒 (OMEGA, 美国) 提取 DNA,溶于 50 μL ddH₂O 中,使用分光光度计 (Eppendorf, 德国) 测定浓度及 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值,并用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测提取 DNA 质量。DNA 样品于 -20°C 保存备用。分别设置 4 个不同数量的样本,即单头 (1RLF),2 头 (2RLF),3 头 (3RLF) 和 5 头 (5RLF)。

1.3 PCR 扩增肠道稻纵卷叶螟细菌的 16S rDNA

以上述方法提取的总 DNA 为模板,对 16S rDNA 进行 PCR 扩增。用引物:

338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3';

806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'。

扩增稻纵卷叶螟肠道的 16S rDNA 的 V3-V4 区域。所用的 Taq 酶为 TransStart Fastpfu DNA Polymerase (TransGen, 北京),PCR 反应体系 (20 μL): 10 $\times$ Buffer 2 μL ,引物 338F/806R (10 mmol/L) 各 0.8 μL ,2.5 mmol/L dNTPs 2 μL ,rTaq Polymerase 0.2 μL ,BSA 0.2 μL ,DNA 10 ng,ddH₂O 补足至

20 μL 。PCR 仪:ABI GeneAmp® 9700。PCR 的反应条件:95 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min,95 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s,55 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 复性 45 s,共 30 个循环,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min,10 $^\circ\text{C}$ 保温。

1.4 PCR 产物纯化

将 PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒 (AXYGEN 公司) 切胶回收 PCR 产物,Tris-HCl 洗脱;2% 琼脂糖电泳检测。

1.5 Miseq 文库建立及高通量测序

回收的扩增目的片段,用 T4 DNA Polymerase Klenow DNA Polymerase 和 T4 PNK 将打断形成的粘性末端修复成平末端,再通过 3'端加碱基“A”,使得 DNA 片段能与 3'端带有“T”碱基的特殊接头连接,以基因组 DNA 为模版,进行融合引物 PCR,磁珠筛选目的 Amplicon 片段,最后,用合格的文库进行 cluster 制备和 Illumina 测序,采用双末端 (paired end) 测序。

1.6 序列数据分析

根据 index 序列区分各个样本数据,提取出的数据以 fastq 格式保存,里面为测序两端的 reads,序列按顺序一一对应。Miseq 测序得到双端序列数据,首先根据 PE reads 之间的 overlap 关系将成对的 reads 拼接成一条序列,并对 reads 的质量和拼接的效果进行质控过滤,根据序列首尾两端的 barcode 和引物序列区分样品得到有效序列,并校正序列方向。

1.7 肠道微生物系型鉴定和多样性分析

利用软件 USEARCH (v7.1) 在 97% 相似度下进行操作分类单元聚类,利用软件 QIIME (v1.17) 将 OTU 代表序列进行比对 (16S 通过 PyNAST 算法与数据库 Silva_108_core_aligned_seqs 进行比对)。通过 OTU 的丰度文件,从 OTU 比对文件中挑选出每个属丰度最高的 OTU 的序列作为该属的代表序列。将 OTU 和物种注释结合,从而得到样品的 OTUs 和分类谱系的基本分析结果。再对 OTUs 进行丰度、Alpha 多样性指数等分析,同时对物种注释在各个分类水平上进行群落结构的统计分析。其中,Alpha 多样性是指对单个样品中物种多样性的分析,本研究分析了 Chao 指数、Ace 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数 (Chao, 1984; Chao *et al.*, 2000; Kuczynski *et al.*, 2011)。Chao 指数、Ace 指数反映样品中群落丰富度,而 Shannon 指数反映群落的多样性,Simpson 指数反映群落中优势种的集中程度。

Chao 指数、Ace 指数和 Shannon 指数越大, Simpson 指数越小, 说明样品中的物种越丰富多样。

2 结果与分析

2.1 序列拼接和组装

稻纵卷叶螟幼虫肠道的 16S rDNA 基因序列文

库共获得 165 386 条 reads, 在 97% 相似度下可将其聚类为用于物种分类的 604 个 OTUs。其中, 稻纵卷叶螟样本 1RLF 共有 42 316 条 reads, 聚类为 204 个 OTUs; 样本 2RLF 共有 38 076 条 reads, 聚类为 487 个 OTUs; 样本 3RLF 共有 43 450 条 reads, 聚类为 190 个 OTUs; 样本 5RLF 共有 41 544 条 reads, 聚类为 401 个 OTUs(表 1)。

表 1 稻纵卷叶螟 4 龄幼虫肠道细菌测序的基本信息

Table 1 Sequencing information of bacteria in the intestine of the 4th instar larvae of *Cnaphalocrocis medinalis*

样本 Sample	有效 reads 数目(条) Number of valid reads	OTU 数目(个) Number of OTUs	不同分类阶元归类数目(个) Number of different taxonomic categories					
			门	纲	目	科	属	种
			Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
1RLF	42 316	204	14	24	48	78	109	94
2RLF	38 076	487	20	37	71	126	178	204
3RLF	43 450	190	12	22	43	72	97	91
5RLF	41 544	401	17	34	61	104	150	174
合计 Total	165 386	604	22	43	82	142	204	244

1RLF-5RLF: 分别为 1~5 头幼虫 1-5 larvae, respectively. 下同 The same below.

2.2 稻纵卷叶螟 4 龄幼虫肠道微生物种类及其丰度

基于 OTUs 的注释结果, 4 个样本合并的总体样本共获得 22 个门, 43 个纲, 82 个目, 142 个科, 204 个属, 244 个种; 其中稻纵卷叶螟样本 1RLF 鉴定获得 14 个门, 24 个纲, 48 个目, 78 个科, 109 个属, 94 个种; 样本 2RLF 共鉴定获得 20 个门, 37 个纲, 71 个目, 126 个科, 178 个属, 204 个种; 样本 3RLF 共鉴定获得 12 个门, 22 个纲, 43 个目, 72 个科, 97 个属, 91 个种; 样本 5RLF 共鉴定获得 17 个门, 34 个纲, 61 个目, 104 个科, 150 个属, 174 个种(表 1)。

在门分类阶元水平上, 稻纵卷叶螟幼虫肠道微生物的 16S rDNA 基因序列共注释到了变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、异常球菌栖热群门(Deinococcus-Thermus)、Latescibacteria、Saccharibacteria 和蓝细菌门(Cyanobacteria)等 22 个门。如图 1 所示, 4 个样本肠道细菌的优势门均为变形菌门(26%~34%)(括号内数值为相对丰度, 下同)、放线菌门(23%~32%)、绿弯菌门(9%~12%)、酸杆菌门(10%~11%)、厚壁菌门(4%~10%)、拟杆菌门(5%~7%)。但不同数量样本肠道细菌的优势门的相对丰度有所不同, 如 1RLF 的优势菌变形菌门和放线

菌门, 分别占 34% 和 26%; 2RLF, 3RLF 和 5RLF 的优势菌变形菌门和放线菌门, 分别占 26% 和 23%, 33% 和 32%, 以及 33% 和 32%(图 1)。总体样本中稻纵卷叶螟肠道细菌主要优势菌与分样本一致; 其中变形菌门占 25%, 放线菌门占 22%, 酸杆菌门占 11%, 绿弯菌门占 11%, 厚壁菌门与拟杆菌门各占 8%。

在纲分类阶元水平上, 共注释了 43 个纲, 主要有放线菌纲(Actinobacteria)、酸杆菌纲(Acidobacteria)、 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)、 β -变形菌纲(Betaproteobacteria)、 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)、芽孢杆菌纲(Bacilli)、厌氧绳菌纲(Anaerolineae)、 δ -变形菌纲(Deltaproteobacteria)、梭菌纲(Clostridia)、芽单胞菌纲(Gemmatimonadetes)、拟杆菌纲(Bacteroidia)、黄杆菌纲(Flavobacteriia)、硝化螺旋菌纲(Nitrospira)和绿弯菌纲(Chloroflexia)等(图 2); 其中不同头数的稻纵卷叶螟肠道细菌的优势纲均为放线菌纲(23%~32%)、酸杆菌纲(9%~11%)、 α -变形菌纲(10%~13%)、 β -变形菌纲(6%~8%)、 γ -变形菌纲(6%~12%)。总体样本中稻纵卷叶螟肠道细菌优势菌纲没有变化, 优势菌的相对丰度分别为放线菌纲(22%)、酸杆菌纲(11%)、 α -变形菌纲(9%)、 β -变形菌纲(7%)、 γ -变形菌纲(6%)。

在目分类阶元水平, 共注释了 82 个目, 主要有根瘤菌目(Rhizobiales)、伯克氏菌目(Burkholderiales)、

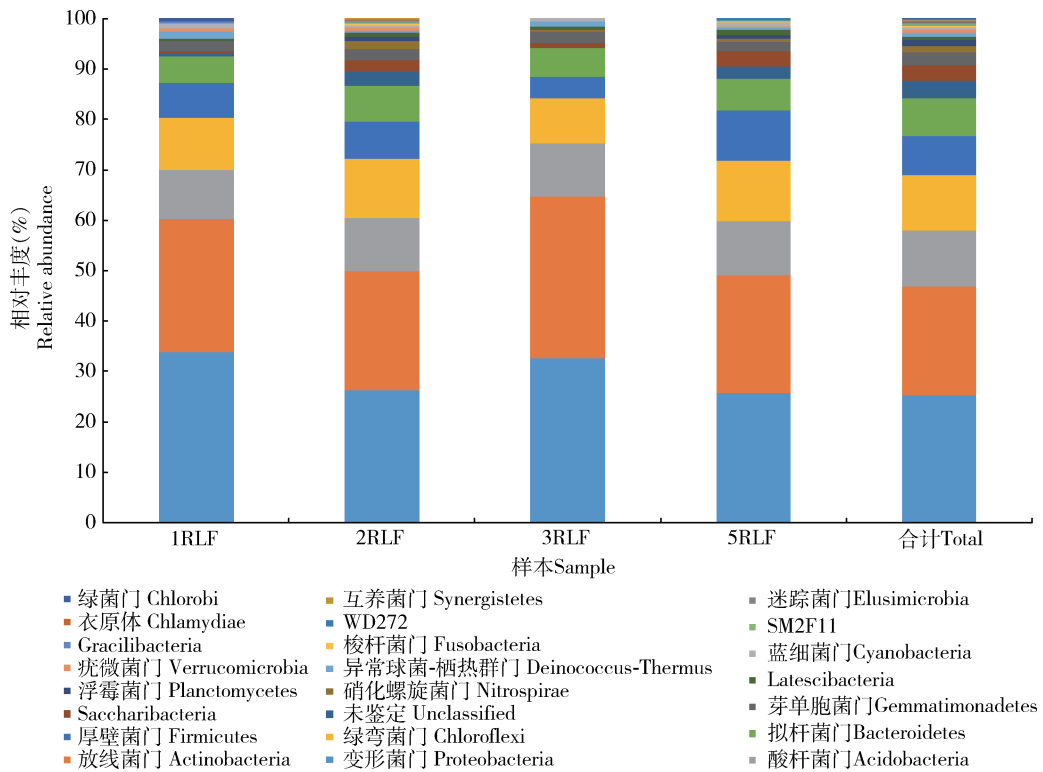


Fig. 1 Phylum-based proportional composition of the intestine bacteria in the 4th instar larvae of *Cnaphalocrocis medinalis*

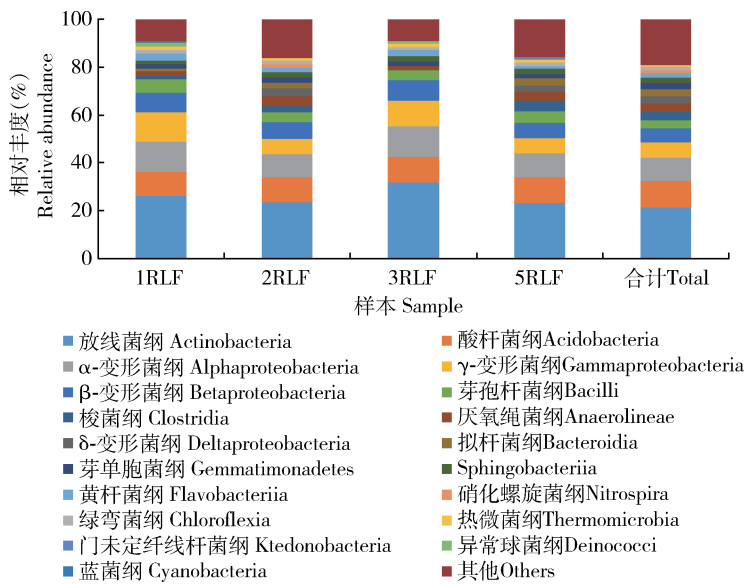


Fig. 2 Class-based proportional composition of the intestine bacteria in the 4th instar larvae of *Cnaphalocrocis medinalis*

假单胞菌目 (Pseudomonadales)、黄单胞菌目 (Xanthomonadales)、黄杆菌目 (Flavobacteriales)、芽孢杆菌目 (Bacillales)、酸微菌目 (Acidimicrobiales)、乳酸杆菌目 (Lactobacillales)、鞘脂单胞菌目 (Sphingomonadales)、肠杆菌目 (Enterobacteriales)、厌氧绳菌目 (Anaerolineales)、微球菌目

(Micrococcales)、丙酸杆菌目 (Propionibacteriales)、棒杆菌目 (Corynebacteriales) 和 Gaiellales 等 (图 3)。稻纵卷叶螟样本 1RLF 在目水平主要有根瘤菌目 (6.9%)、伯克氏菌目 (6.4%)、丙酸杆菌目 (5.9%)、Subgroup_6 (4.4%)、微球菌目 (4.4%)；稻纵卷叶螟样本 2RLF 在目水平上的细菌主要有 Subgroup_6

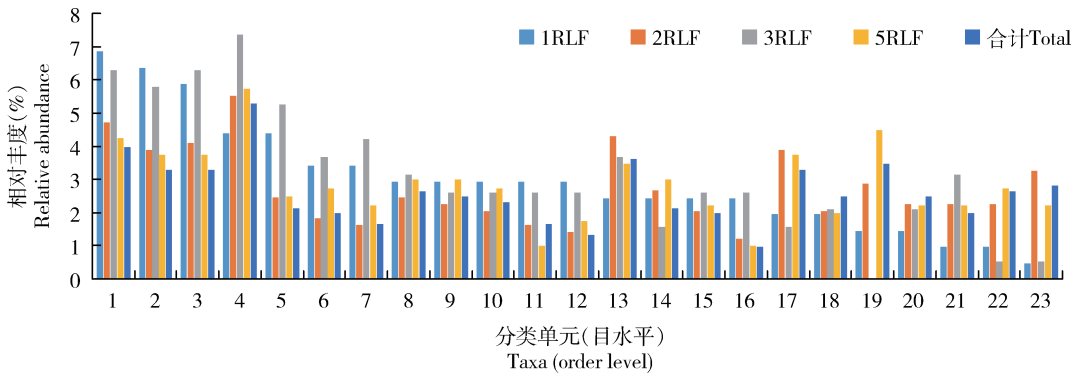


图3 稻纵卷叶螟4龄幼虫肠道细菌的目水平组成和结构

Fig. 3 Order-based proportional composition of the intestine bacteria in the 4th instar larvae of *Cnaphalocrocis medinalis*
1: 根瘤菌目 Rhizobiales; 2: 伯克氏菌目 Burkholderiales; 3: 丙酸杆菌目 Propionibacteriales; 4: Subgroup_6; 5: 微球菌目 Micrococcales; 6: 棒杆菌目 Corynebacteriales; 7: 假单胞菌目 Pseudomonadales; 8: Gaiellales; 9: 黄单胞菌目 Xanthomonadales; 10: Subgroup_4; 11: 黄杆菌目 Flavobacteriales; 12: 芽孢杆菌目 Bacillales; 13: 酸微菌目 Acidimicrobiales; 14: 乳酸杆菌目 Lactobacillales; 15: 鞘脂单胞菌目 Sphingomonadales; 16: 肠杆菌目 Enterobacteriales; 17: 厌氧绳菌目 Anaerolineales; 18: 芽单胞菌目 Gemmatimonadales; 19: 梭菌目 Clostridiales; 20: 鞘脂杆菌目 Sphingobacteriales; 21: 土壤红杆菌目 Solirubrobacteriales; 22: 拟杆菌目 Bacteroidales; 23: 粘球菌目 Myxococcales.

(5.5%)、根瘤菌目(4.7%)、酸微菌目(4.3%)、丙酸杆菌目(4.1%)、伯克氏菌目(3.9%);稻纵卷叶螟样本3RLF肠道细菌在目水平上主要有 Subgroup_6 (7.4%)、根瘤菌目(6.3%)、丙酸杆菌目(6.3%)、伯克氏菌目(5.8%)、微球菌目(5.2%);稻纵卷叶螟样本5RLF肠道细菌在目水平上主要有 Subgroup_6 (5.7%)、梭菌目(Clostridiales)(4.5%)、根瘤菌目(4.2%)、丙酸杆菌目(3.7%)和伯克氏菌目(3.7%);总体样本中稻纵卷叶螟肠道细菌相对丰度较高的有 Subgroup_6 (5.3%)、根瘤菌目(4.0%)、酸微菌目(3.6%)、梭菌目(3.5%)、丙酸杆菌目(3.3%)。前5位优势目中,4个样本共有的是根瘤菌目、伯克氏菌目、丙酸杆菌目。

在科分类阶元水平,共注释了142个科,主要有类诺卡氏菌科(Nocardioideaceae)、黄杆菌科(Flavobacteriaceae)、丛毛单胞菌科(Comamonadaceae)、肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、黄单胞菌科(Xanthomonadaceae)、鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaceae)、伯克氏菌科(Burkholderiaceae)、莫拉氏菌科(Moraxellaceae)、芽单胞菌科(Gemmatimonadaceae)、RB41、厌氧绳菌科(Anaerolineaceae)、芽孢杆菌科(Bacillaceae)、酸微菌科(Acidimicrobiaceae)、微杆菌科(Microbacteriaceae)、微球菌科(Micrococceae)和假单胞菌科(Pseudomonadaceae)等(表2)。其中,稻纵卷叶螟样本1RLF在科水平上主要的肠道微生物是类诺卡氏菌科(5.9%)、黄杆菌科(2.9%)、丛毛单胞菌科(2.5%)、肠杆菌科(2.5%)和黄单胞菌科(2.5%)等;样本2RLF在科水平上主要的肠道微生物是类

诺卡氏菌科(4.1%)、厌氧绳菌科(3.9%)、芽单胞菌科(2.1%)、丛毛单胞菌科(1.8%)和酸微菌科(1.8%)等;样本3RLF在科水平上主要的肠道微生物是类诺卡氏菌科(6.3%)、丛毛单胞菌科(2.6%)、黄杆菌科(2.6%)、肠杆菌科(2.6%)和莫拉氏菌科(2.6%)等;样本5RLF在科水平上主要的肠道微生物是类诺卡氏菌科(3.7%)、厌氧绳菌科(3.7%)、黄单胞菌科(2.2%)、芽单胞菌科(2.0%)和丛毛单胞菌科(1.7%)等;总体样本中,类诺卡氏菌科(3.3%)、厌氧绳菌科(3.3%)、芽单胞菌科(2.5%)、黄单胞菌科(1.8%)和黄杆菌科(1.7%)相对丰度较高。在前15位优势科中,稻纵卷叶螟的4个样本共有的优势菌为类诺卡氏菌科、丛毛单胞菌科、黄单胞菌科、鞘脂单胞菌科、厌氧绳菌科和芽单胞菌科和RB41(表2)。此外,样本1RLF和3RLF,2RLF和5RLF在肠道微生物不同的科上的分布较为相似。

在属分类阶元水平上,主要有类诺卡氏属 *Nocardioides*、鞘脂单胞菌属 *Sphingomonas*、乳杆菌属 *Lactobacillus*、黄杆菌属 *Flavobacterium*、芽孢杆菌属 *Bacillus*、假单胞菌属 *Pseudomonas*、不动杆菌属 *Acinetobacter*、罗思河小杆菌属 *Rhodanobacte*、*Solirubrobacter*、玫瑰弯菌属 *Roseiflexus* 和分枝杆菌属 *Mycobacterium* 等(表3)。稻纵卷叶螟样本1RLF在属水平上主要的肠道微生物是类诺卡氏属(3.9%)、鞘脂单胞菌属(2.0%)、芽孢杆菌属(2.0%)、玫瑰弯菌属(1.5%)和分枝杆菌属(1.5%)等;稻纵卷叶螟样本2RLF在属水平上主要的肠道微生物是类诺卡氏属(3.1%)、硝化螺旋菌属(1.6%)、玫瑰弯菌

表 2 科水平上丰度排名前 15 的稻纵卷叶螟 4 龄幼虫肠道细菌菌群

Table 2 Top 15 abundance of intestinal bacterial communities at the family level in the 4th instar larvae of *Cnaphalocrocis medinalis*

样本 Sample				合计 Total
1RLF	2RLF	3RLF	5RLF	
类诺卡氏菌科 Nocardioideaceae(5.9%)	类诺卡氏菌科 Nocardioideaceae(4.1%)	类诺卡氏菌科 Nocardioideaceae(6.3%)	类诺卡氏菌科 Nocardioideaceae(3.7%)	类诺卡氏菌科 Nocardioideaceae(3.3%)
黄杆菌科 Flavobacteriaceae(2.9%)	厌氧绳菌科 Anaerolineaceae(3.9%)	从毛单胞菌科 Comamonadaceae(2.6%)	厌氧绳菌科 Anaerolineaceae(3.7%)	厌氧绳菌科 Anaerolineaceae(3.3%)
黄单胞菌科 Xanthomonadaceae(2.5%)	芽单胞菌科 Gemmatimonadaceae(2.1%)	黄杆菌科 Flavobacteriaceae(2.6%)	黄单胞菌科 Xanthomonadaceae(2.2%)	芽单胞菌科 Gemmatimonadaceae(2.5%)
从毛单胞菌科 Comamonadaceae(2.5%)	从毛单胞菌科 Comamonadaceae(1.8%)	肠杆菌科 Enterobacteriaceae(2.6%)	芽单胞菌科 Gemmatimonadaceae(2.0%)	黄单胞菌科 Xanthomonadaceae(1.8%)
鞘脂单胞菌科 Sphingomonadaceae(2.5%)	酸微菌科 Acidimicrobiaceae(1.8%)	莫拉氏菌科 Moraxellaceae(2.6%)	从毛单胞菌科 Comamonadaceae(1.7%)	黄杆菌科 Flavobacteriaceae(1.7%)
肠杆菌科 Enterobacteriaceae(2.5%)	黄杆菌科 Flavobacteriaceae(1.6%)	芽单胞菌科 Gemmatimonadaceae(2.1%)	鞘脂单胞菌科 Sphingomonadaceae(1.7%)	从毛单胞菌科 Comamonadaceae(1.5%)
伯克氏菌科 Burkholderiaceae(2.5%)	黄单胞菌科 Xanthomonadaceae(1.6%)	黄单胞菌科 Xanthomonadaceae(2.1%)	亚硝化单胞菌科 Nitrosomonadaceae(1.7%)	鞘脂单胞菌科 Sphingomonadaceae(1.5%)
厌氧绳菌科 Anaerolineaceae(2.0%)	鞘脂单胞菌科 Sphingomonadaceae(1.6%)	鞘脂单胞菌科 Sphingomonadaceae(2.1%)	毛螺旋菌科 Lachnospiraceae(1.7%)	酸微菌科 Acidimicrobiaceae(1.5%)
芽单胞菌科 Gemmatimonadaceae(2.0%)			莫拉氏菌科 Moraxellaceae(1.5%)	亚硝化单胞菌科 Nitrosomonadaceae(1.3%)
酸微菌科 Acidimicrobiaceae(2.0%)	亚硝化单胞菌科 Nitrosomonadaceae(1.4%)	伯克氏菌科 Burkholderiaceae(2.1%)	RB41(1.5%)	毛螺旋菌科 Lachnospiraceae(1.3%)
莫拉氏菌科 Moraxellaceae(2.0%)	Haliangiaceae(1.4%)	微杆菌科 Microbacteriaceae(2.1%)	酸微菌科 Acidimicrobiaceae(1.5%)	莫拉氏菌科 Moraxellaceae(1.2%)
		厌氧绳菌科 Anaerolineaceae(1.6%)	Roseiflexaceae(1.5%)	RB41(1.2%)
RB41(2.0%)	RB41(1.2%)	芽孢杆菌科 Bacillaceae(1.6%)	乳杆菌科 Lactobacillaceae(1.5%)	Roseiflexaceae(1.2%)
芽孢杆菌科 Bacillaceae(2.0%)	乳杆菌科 Lactobacillaceae(1.2%)	微球菌科 Micrococcaceae(1.6%)	拟杆菌科 Bacteroidaceae(1.5%)	Haliangiaceae(1.2%)
Roseiflexaceae(1.5%)	肠杆菌科 Enterobacteriaceae(1.2%)	假单胞菌科 Pseudomonadaceae(1.6%)	生丝微菌科 Hyphomicrobiaceae(1.2%)	乳杆菌科 Lactobacillaceae(1.0%)
生丝微菌科 Hyphomicrobiaceae(1.5%)	毛螺旋菌科 Lachnospiraceae(1.2%)			

属(1.4%)、*Haliangium*(1.4%)和鞘脂单胞菌属(1.0%)等;稻纵卷叶螟样本3RLF在属水平上主要的肠道微生物是类诺卡氏属(4.2%)、鞘脂单胞菌(2.1%)、芽孢杆菌属(1.6%)、假单胞菌属(1.6%)和罗思河小杆菌属(1.6%)等;稻纵卷叶螟样本5RLF在属水平上主要的肠道微生物是类诺卡氏属(2.5%)、鞘脂单胞菌属(1.5%)、玫瑰弯菌属(1.5%)、拟杆菌属(1.5%)和乳杆菌属(1.2%);总体样本中类诺卡氏属(2.5%)、硝化螺旋菌属(1.3%)、玫瑰弯菌属(1.2%)、*Haliangium*(1.2%)和鞘脂单胞菌属(1.0%)相对丰度较高。表3列出了不同数量样本及样本总和的前15位优势菌及其丰度。前5位优势属中,4个样本共有优势属为类诺卡氏属和鞘脂单胞菌属(表3)。

2.3 稻纵卷叶螟幼虫肠道细菌多样性分析

由表4可知,稻纵卷叶螟幼虫肠道细菌种类有较高的丰富度和多样性,稻纵卷叶螟肠道微生物Simpson指数、Shannon指数、Ace指数和Chao指数分别为0.16~0.65,0.94~3.22,212~488和210~490。1RLF和3RLF的Chao指数(分别为221和212)、Ace指数(分别为223和210)均低于2RLF和5RLF的Chao指数(分别为488和407)、Ace指数(分别为490和411),说明2RLF和5RLF肠道中微生物群落的丰富度较高。2RLF和5RLF的Shannon指数(分别为3.22和1.87)远大于1RLF和3RLF的Shannon指数,说明2RLF和5RLF的肠道微生物群落多样性高。1RLF,3RLF和5RLF的Simpson指数远大于2RLF的Simpson指数,说明稻纵卷叶螟

表 3 属水平上丰度排名前 15 的稻纵卷叶螟 4 龄幼虫肠道菌群

Table 3 Top 15 abundance of intestinal bacterial communities at the genus level in the 4th instar larvae of *Cnaphalocrocis medinalis*

样本 Sample				合计 Total
1RLF	2RLF	3RLF	5RLF	
类诺卡氏属 <i>Nocardioides</i> (3.9%)	类诺卡氏属 <i>Nocardioides</i> (3.1%)	类诺卡氏属 <i>Nocardioides</i> (4.2%)	类诺卡氏属 <i>Nocardioides</i> (2.5%)	类诺卡氏属 <i>Nocardioides</i> (2.5%)
鞘脂单胞菌属 <i>Sphingomonas</i> (2.0%)	硝化螺菌属 <i>Nitrospira</i> (1.6%)	鞘脂单胞菌属 <i>Sphingomonas</i> (2.1%)	鞘脂单胞菌属 <i>Sphingomonas</i> (1.5%)	硝化螺菌属 <i>Nitrospira</i> (1.3%)
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i> (2.0%)	玫瑰弯菌属 <i>Roseiflexus</i> (1.4%)	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i> (1.6%)	玫瑰弯菌属 <i>Roseiflexus</i> (1.5%)	玫瑰弯菌属 <i>Roseiflexus</i> (1.2%)
玫瑰弯菌属 <i>Roseiflexus</i> (1.5%)	<i>Haliangium</i> (1.4%)	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> (1.6%)	拟杆菌属 <i>Bacteroides</i> (1.5%)	<i>Haliangium</i> (1.0%)
分枝杆菌属 <i>Mycobacterium</i> (1.5%)	鞘脂单胞菌属 <i>Sphingomonas</i> (1.0%)	罗思河小杆菌属 <i>Rhodanobacter</i> (1.6%)	乳杆菌属 <i>Lactobacillus</i> (1.2%)	鞘脂单胞菌属 <i>Sphingomonas</i> (1.0%)
不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i> (1.5%)	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i> (1.0%)	不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i> (1.6%)	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i> (1.0%)	拟杆菌属 <i>Bacteroides</i> (1.0%)
<i>Gaiella</i> (1.5%)	<i>Gaiella</i> (1.0%)	<i>Solirubrobacter</i> (1.6%)	分枝杆菌属 <i>Mycobacterium</i> (1.0%)	<i>Gaiella</i> (1.0%)
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> (1.5%)	乳杆菌属 <i>Lactobacillus</i> (1.0%)	玫瑰弯菌属 <i>Roseiflexus</i> (1.1%)	<i>Haliangium</i> (1.0%)	芽单胞菌属 <i>Gemmatimonas</i> (1.0%)
柯克斯氏体属 <i>Coxiella</i> (1.5%)	<i>Bryobacter</i> (1.0%)	<i>Gaiella</i> (1.1%)	狭义梭菌 1 <i>Clostridium sensu stricto</i> 1(1.0%)	乳杆菌属 <i>Lactobacillus</i> (0.8%)
乳杆菌属 <i>Lactobacillus</i> (1.0%)	狭义梭菌 1 <i>Clostridium sensu stricto</i> 1(1.0%)	分枝杆菌属 <i>Mycobacterium</i> (1.1%)	不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i> (0.7%)	<i>Bryobacter</i> (0.8%)
黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i> (1.0%)	分枝杆菌属 <i>Mycobacterium</i> (0.6%)	短波单胞菌属 <i>Brevundimonas</i> (1.1%)	<i>Gaiella</i> (0.7%)	狭义梭菌 1 <i>Clostridium sensu stricto</i> 1(0.8%)
罗思河小杆菌属 <i>Rhodanobacter</i> (1.0%)	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> (0.6%)	黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i> (1.1%)	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> (0.7%)	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i> (0.8%)
短波单胞菌属 <i>Brevundimonas</i> (1.0%)	黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i> (0.6%)	甲基杆菌属 <i>Methylobacterium</i> (1.1%)	罗思河小杆菌属 <i>Rhodanobacter</i> (0.7%)	分枝杆菌属 <i>Mycobacterium</i> (0.7%)
红球菌属 <i>Rhodococcus</i> (1.0%)	罗思河小杆菌属 <i>Rhodanobacter</i> (0.6%)	红球菌属 <i>Rhodococcus</i> (1.1%)	短波单胞菌属 <i>Brevundimonas</i> (0.7%)	黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i> (0.7%)
链霉菌属 <i>Streptomyces</i> (1.0%)	短波单胞菌属 <i>Brevundimonas</i> (0.6%)	链霉菌属 <i>Streptomyces</i> (1.1%)	<i>Marmoricola</i> (0.7%)	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> (0.5%)

表 4 不同头数的稻纵卷叶螟 4 龄幼虫肠道细菌的多样性指数统计

Table 4 Alpha diversity of the intestine bacteria in the 4th instar larvae of *Cnaphalocrocis medinalis*

样本 Sample	多样性指数 Diversity index			
	Ace	Chao	Shannon	Simpson
1RLF	221	223	1.16	0.5585
2RLF	488	490	3.22	0.1617
3RLF	212	210	0.94	0.6507
5RLF	407	411	1.87	0.5321

1RLF, 3RLF 和 5RLF 肠道微生物的优势种集中程度低于 2RLF。不同头数稻纵卷叶螟肠道微生物丰富度和多样性有所不同,其中 5RLF 的丰富度、多样性和优势种的集中程度可能更能反映稻纵卷叶螟群体肠道微生物的真实水平。

3 讨论

本研究采用 16S rDNA 和 Illumina Miseq 技术首次开展稻纵卷叶螟幼虫肠道细菌菌落组成分析,一共注释鉴定获得 22 个门,43 个纲,82 个目,142 个科,204 个属,244 个种。利用传统的细菌分离培养技术在稻纵卷叶螟肠道中仅获得 6 个纲,15 个属,25 个种,其分离鉴定的 15 个属分别为短波单胞菌属 *Brevundimonas*、假单胞菌属、伯克氏菌属 *Burkholderia*、不动杆菌属、哈夫尼菌属 *Hafnia*、克雷伯菌属 *Klebsiella*、红球菌属 *Rhodococcus*、微杆菌属 *Microbacterium*、微球菌属 *Micrococcus*、链霉菌属 *Streptomyces*、鞘脂杆菌属 *Sphingobacterium*、芽孢杆菌属、肠球菌属 *Enterococcus*、微小杆菌属

Exiguobacterium 和葡萄球菌属 *Staphylococcus* (杨焯, 2012)。本研究中也检测到这些菌,还发现其中短波单胞菌属、假单胞菌属、不动杆菌属等菌在丰度上属于前15位优势属。细菌分离培养技术仅可以获得可培养细菌信息,而本研究利用16S rDNA和Illumina Miseq技术不仅可以获取大量可以培养细菌信息,还可测到许多不可培养的细菌,有些不可培养的细菌还属于优势菌。相对于传统的分离培养技术,16S rDNA和Illumina Miseq技术能够更加全面地揭示肠道微生物的组成和多样性。

本研究表明,4个不同数量的稻纵卷叶螟样本在门水平上优势肠道细菌均为变形菌门(26%~34%)、放线菌门(23%~32%)、绿弯菌门(9%~12%)、酸杆菌门(10%~11%)、厚壁菌门(4%~10%)和拟杆菌门(5%~7%)。已有研究表明,暗黑鳃金龟 *Holotrichia parallela* 幼虫肠道优势菌同样也为变形菌门、放线菌门(Huang and Zhang, 2013)。在已研究的几种鳞翅目昆虫中,舞毒蛾 *Lymantria dispar*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、家蚕 *Bombyx mori*、小菜蛾 *Plutella xylostella* 幼虫肠道中的优势菌为变形菌门、厚壁菌门(Broderick *et al.*, 2004; Priya *et al.*, 2012; Xia *et al.*, 2013; 周洪英等, 2015)。变形菌门也是许多昆虫肠道中的优势菌,在双翅目的南亚果实蝇 *Bactrocera tau*、泽兰实蝇 *Procecidochares utilis*、柑橘大实蝇地中海实蝇 *Ceratitidis capitata* 和沙蝇 *Lutzomyia longipalpis* (Behar *et al.*, 2008; Gouveia *et al.*, 2008; Prabhakar *et al.*, 2012; 张某等, 2016),直翅目的沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* (Dillon *et al.*, 2010),半翅目的豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*、黑豆蚜 *Aphis fabae*、点蜂缘椿象 *Riptortus clavatus*、扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis*、鞘翅目的天牛 *Saperda vestita* 以及鳞翅目的茶尺蠖 *Ectropis obliqua* 均有报道(Grenier *et al.*, 1994; Haynes *et al.*, 2003; Dillon and Dillon, 2004)。不同昆虫主要优势菌的顺序也有差异,如光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* 肠道优势菌依次为变形菌门、厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门(Schloss *et al.*, 2006),白蚁 *Reticulitermes speratus* 肠道优势菌依次为拟杆菌门、厚壁菌门、螺旋体门(Spirochaetes)、变形菌门(Hongoh *et al.*, 2003)。

在鉴定获得的稻纵卷叶螟4个样本前5位优势属中共同的优势属为类诺卡氏属和鞘脂单胞菌属。不同种类的昆虫肠道菌优势属存在差异。在已经开展研究的其他鳞翅目昆虫中,如豆天蛾 *Clanis*

bilineata tsingtauca 肠道微生物优势属为葡萄球菌属和芽孢杆菌(吕飞和刘玉升, 2009);舞毒蛾肠道微生物优势属为肠球菌属(Broderick *et al.*, 2004);家蚕肠道微生物优势属为芽孢杆菌属和弓形菌属 *Arcobacter* (周洪英等, 2015);贡嘎蝠蛾 *Hepialus gonggaensis* 肠道微生物优势属为肉食杆菌属 *Carnobacterium* (刘莉等, 2008)。

稻纵卷叶螟数量不同的4个样本之间微生物种类与结构有一定的差异。4个样本中,2RLF和5RLF肠道中微生物群落的丰富度高于1RLF和3RLF的,1RLF,3RLF和5RLF肠道微生物的优势种集中程度相似,均低于2RLF的,前5位优势属中有类诺卡氏属和鞘脂单胞菌属为共有菌,这反映了稻纵卷叶螟群体中存在一定的个体差异。总和样本的信息更能揭示稻纵卷叶螟种群肠道微生物的种类和结构,不同数量样本的数据则反映了稻纵卷叶螟个体之间肠道微生物的种类和结构。本研究通过不同样本数量处理数据的分析获得共同存在的细菌和优势菌,这可以更全面反映稻纵卷叶螟肠道细菌群落结构和优势菌群。然而,昆虫肠道微生物多样性还与性别、品种、食物以及环境因素相关。许刚等(2015)发现家蚕不同性别之间肠道微生物的组成与丰度比率具有一定的差异,雄蚕肠道中的主要优势细菌为代尔夫特菌属 *Delftia*、橙单胞菌属 *Aurantimonas*、肠球菌属、嗜糖假单胞菌属 *Pelomonas*、青枯菌属 *Ralstonia*、台湾温单胞菌属 *Tepidimonas*、假单胞菌属、阿斯普罗单胞菌属 *Aspromonas*、甲基杆菌属 *Methylobacterium* 和葡萄球菌属;雌蚕肠道中的主要优势细菌为代尔夫特菌属、橙单胞菌属、假单胞菌属、嗜糖假单胞菌属、佩特罗菌属 *Petrobacter*、肠球菌属、台湾温单胞菌属、狭义梭菌属 *Clostridium sensu stricto*、阿斯普罗单胞菌属。雄蚕中有23个属的细菌丰度是雌蚕的1.5倍以上,其中,青枯菌属、根瘤菌属 *Rhizobium*、丛毛单胞菌属 *Aquicella*、肠球菌属、微小杆菌属和橙单胞菌属的细菌丰度分别是雌蚕的10.34, 6.31, 6.31, 6.31, 5.42, 4.73和4.38倍;而在雌蚕中有7个属的细菌丰度是雄蚕的1.5倍以上,其中,狭义梭菌属和苍白杆菌属 *Ochrobactrum* 分别是雄蚕的9.19和5.07倍。对毒死蜱高抗的小菜蛾品系相对于敏感品系,其肠道中乳酸杆菌目、假单胞杆菌目、黄单胞杆菌目相对丰度更高(Colman *et al.*, 2012; Xia *et al.*, 2013)。进一步研究不同环境压力下的稻纵卷叶螟肠道微生物,有助于更加全面地了解稻纵卷叶

螟幼虫肠道细菌的多样性。

昆虫肠道微生物通过与宿主的互惠共生,相互依存,促进和提高了昆虫的生命活动。肠道微生物在与其宿主长期的协同进化过程中,形成了共同的进化机制。稻纵卷叶螟幼虫共鉴定出来 204 个属,其中许多属可能参与了稻纵卷叶螟的生命活动。不动杆菌属、鞘脂菌属、肠杆菌属、乳酸杆菌属等可能参与稻纵卷叶螟肠道营养物质代谢。不动杆菌属、鞘脂菌属可能与具有氮素转化的功能;肠杆菌属可能参与编码纤维素降解的 1, 4- β -纤维双糖水解酶(1, 4-beta-cellobiosidase)、内切葡聚糖酶(endoglucanase)和 β -葡糖苷酶(beta-glucosidase)以及木聚糖降解的 1, 4- β -木糖苷酶(1, 4-beta-xylosidase);乳酸杆菌属可能具有合成果胶降解酶(pectin-degrading enzymes)、糖苷水解酶(glycoside hydrolases)、多糖水解酶(polysaccharide lyases)等降解碳水化合物功能(Potrikus and Breznak, 1977; Warnecke *et al.*, 2007; Nalcaci *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2013)。稻纵卷叶螟肠道菌群中也发现可能与食物中有毒物质降解有关的菌(肠球菌属、乳酸杆菌属、伯克氏菌属、红球菌属)。乳酸杆菌属的细菌对抗药性的产生有一定的积极作用;肠球菌属可以降低昆虫肠道 pH 值,有助于保护其免受毒素的攻击;伯克氏菌属可将杀螟松水解为 3-甲基-4-对硝基苯酚;红球菌属可产生一些降解对昆虫有害的单萜烯类物质的酶(Broderick *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2013;)。稻纵卷叶螟肠道中埃希氏杆菌属 *Escherichia*、葡萄球菌属、假单胞杆菌属可能参与了自身的免疫反应。当家蚕幼虫取食富含埃希氏杆菌属、葡萄球菌属的食料时,葛佬素(gloverin)和溶菌酶(lysozyme)基因表达均上调,当家蚕取食含有假单胞杆菌属的食料时,葛佬素 2 和葛佬素 3 表达上调,且与免疫相关的通路-9 的表达上调,这说明这 3 种肠道菌与家蚕的免疫信号通路有密切的关系(Douglas, 2015)。此外,4 个稻纵卷叶螟样本中均检测到的肠道微生物有沃尔巴克氏体属 *Wolbachia*。沃尔巴克氏体菌是一类研究比较深入的共生菌,它广泛存在于节肢动物体内,具有诱导胞质不亲和、诱导孤雌生殖等多种方式调控寄主生殖行为的能力,此外沃尔巴克氏体属还能增强宿主的抗逆性,如沃尔巴克氏体菌能增强尖音库蚊 *Culex pipiens* 对杀虫剂的抗性;能通过调控寄主植物的生理来使斑幕潜叶蛾 *Phyllonorycter blancardella* 在衰老的寄主植物上正常生长发育(Duron *et al.*,

2006; Fytrou *et al.*, 2006; Kaiser *et al.*, 2010)。

昆虫肠道微生物多样性丰富,许多菌群与昆虫长期进化维持共生关系,在昆虫生命活动中起着重要的作用。研究昆虫肠道微生物有利于了解昆虫的生命活动过程,为基于肠道微生物开发新的绿色防控技术奠定基础。本研究分析了水稻上稻纵卷叶螟幼虫肠道微生物结构与多样性,首次利用 16S rDNA 和 Illumina Miseq 技术获得了稻纵卷叶螟肠道微生物相关信息,有利于今后进一步研究和利用肠道微生物。今后,还将重点挖掘和研究具有重要功能的稻纵卷叶螟肠道微生物,为稻纵卷叶螟的绿色防控提供新思路和新技术。

参考文献 (References)

- Behar A, Yuval B, Jurkevitch E, 2008. Gut bacterial communities in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) and their impact on host longevity. *J. Insect Physiol.*, 54(9): 1377–1383.
- Boman HG, Hultmark D, 1987. Cell-free immunity in insects. *Ann. Rev. Microbiol.*, 41: 103–126.
- Broderick NA, Raffa KF, Goodman RM, Handelsman J, 2004. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(1): 293–300.
- Broderick NA, Robinson CJ, McMahon MD, Holt J, Handelsman J, Raffa KF, 2009. Contributions of gut bacteria to *Bacillus thuringiensis*-induced mortality vary across a range of Lepidoptera. *BMC Biol.*, 7: 11.
- Chao A, 1984. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J. Stat.*, 11: 265–270.
- Chao A, Hwang WH, Chen YC, Kuo CY, 2000. Estimating the number of shared species in two communities. *Stat. Sin.*, 10: 227–246.
- Chen YN, 1985. Review of the studies on *Cnaphalocrocis medinalis* Guenée. *Entomological Knowledge*, 22(6): 287–289. [陈永年, 1985. 国外稻纵卷叶螟研究概述. 昆虫知识, 22(6): 287–289]
- Colman DR, Toolson EC, Takacs-Vesbach CD, 2012. Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities? *Mol. Ecol.*, 21(20): 5124–5137.
- Dillon RJ, Dillon VM, 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.*, 49(1): 71–92.
- Dillon RJ, Vennard CT, Buckling A, Charnley AK, 2005. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecol. Lett.*, 8: 1291–1298.
- Dillon RJ, Vennard CT, Charnley AK, 2002. A note: gut bacteria produce components of a locust cohesion pheromone. *J. Appl. Microbiol.*, 92: 759–763.
- Dillon RJ, Webster G, Weightman AJ, Charnley AK, 2010. Diversity of gut microbiota increases with aging and starvation in the desert locust. *Anton. Leeuw.*, 97(1): 69–77.

- Douglas AE, 2009. The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Funct. Ecol.*, 23(1): 38–47.
- Douglas AE, 2015. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annu. Rev. Entomol.*, 60: 17–34.
- Duron O, Labbé P, Berticat C, Rousset F, Guillot S, Raymond M, Weill M, 2006. High *Wolbachia* density correlates with cost of infection for insecticide resistant *Culex pipiens* mosquitoes. *Evolution*, 60(2): 303–314.
- Engel P, Martinson VG, Moran NA, 2012. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(27): 11002–11007.
- Engel P, Moran NA, 2013. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.*, 37(5): 699–735.
- Fytro A, Schofield PG, Kraaijeveld AR, Hubbard SF, 2006. *Wolbachia* infection suppresses both host defence and parasitoid counter-defence. *Proc. Roy. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 273(1588): 791–796.
- Gouveia C, Asensi MD, Zahner V, Rangel EF, de Oliveira SM, 2008. Study on the bacterial midgut microbiota associated to different Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). *Neotrop. Entomol.*, 37(5): 597–601.
- Grenier AM, Nardon C, Rahbe Y, 1994. Observations on the microorganisms occurring in the gut of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Entomol. Exp. Appl.*, 70(1): 91–96.
- Hammer TJ, McMillan WO, Fierer N, 2014. Metamorphosis of a butterfly-associated bacterial community. *PLoS ONE*, 9(1): e86995.
- Haynes S, Darby AC, Daniell TJ, Webster G, Van Veen FJF, Godfray HCJ, Douglas AE, 2003. Diversity of bacteria associated with natural aphid populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(12): 7216–7223.
- Hongoh Y, Ohkuma M, Kudo T, 2003. Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 44(2): 231–242.
- Huang S, Zhang H, 2013. The impact of environmental heterogeneity and life stage on the hindgut microbiota of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *PLoS ONE*, 8(2): e57169.
- Itoh H, Aita M, Nagayama A, Meng XY, Kamagata Y, Navarro R, Kikuchi Y, 2014. Evidence of environmental and vertical transmission of *Burkholderia* symbionts in the oriental chinch bug, *Cavelerius saccharivorus* (Heteroptera: Blissidae). *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(19): 5974–5983.
- Kaiser W, Huguet E, Casas J, Commin C, Giron D, 2010. Plant green-island phenotype induced by leaf-miners is mediated by bacterial symbionts. *Proc. Roy. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 277(1692): 2311–2319.
- Kuczynski J, Stombaugh J, Walters WA, González A, Caporaso JG, Knight R, 2011. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Curr. Protoc. Bioinform.*, doi: 10.1002/0471250953.bi1007s36.
- Li CM, Xu J, Yang YJ, Qi JH, Zheng XS, Wang Y, Liu Q, Lu ZX, 2011. Growth and reproduction of *Cnaphalocrocis medinalis* fed on improved artificial diet. *Chinese Journal of Rice Science*, 25(3): 321–325. [李传明, 徐健, 杨亚军, 祁建杭, 郑许松, 王艳, 刘琴, 吕仲贤, 2011. 人工饲料饲养稻纵卷叶螟的生长发育与繁殖. 中国水稻科学, 25(3): 321–325]
- Liu L, Wang ZK, Yu HW, Chen SJ, Yan GF, Xia YX, Yin YP, 2008. Analysis of the bacterial diversity in intestines of *Hepialus gonggaensis* larvae. *Acta Microbiologica Sinica*, 48(5): 616–622. [刘莉, 王中康, 俞和韦, 陈仕江, 阎光凡, 夏玉先, 殷幼平, 2008. 贡嘎蝠蛾幼虫肠道细菌多样性分析. 微生物学报, 48(5): 616–622]
- Lv F, Liu YS, 2009. The identification of dominant intestinal bacteriae of *Clanis bilineata tsingtauca* Mell larva. *Chin. J. Microecol.*, 21(5): 435–439. [吕飞, 刘玉升, 2009. 豆天蛾幼虫肠道优势菌株的鉴定研究. 中国微生态学杂志, 21(5): 435–439]
- Martinson VG, Moy J, Moran NA, 2012. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(8): 2830–2840.
- Nalcaci OO, Böke N, Ovez B, 2011. Potential of the bacterial strain *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* LMG 17238 and macro algae *Gracilaria verrucosa* for denitrification. *Desalination*, 274(1): 44–53.
- Nathan SS, Choi MY, Paik CH, Seo HY, 2007. Food consumption, utilization, and detoxification enzyme activity of the rice leaf folder larvae after treatment with *Dysoxylum triterpenes*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 88(3): 260–267.
- Potrikus CJ, Breznak JA, 1977. Nitrogen-fixing *Enterobacter agglomerans* isolated from guts of wood-eating termites. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33(2): 392–399.
- Prabhakar CS, Sood P, Kanwar SS, Sharma PN, Kumar A, Mehta PK, 2012. Isolation and characterization of gut bacteria of fruit fly, *Bactrocera tau* (Walker). *Phytoparasitica*, 41(2): 193–201.
- Priya NG, Ojha A, Kajla MK, Raj A, Rajagopal R, 2012. Host plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera*. *PLoS ONE*, 7(1): e30768.
- Punithavalli M, Muthukrishnan NM, Balaji RM, 2013. Influence of rice genotypes on folding and spinning behaviour of leaf folder (*Cnaphalocrocis medinalis*) and its interaction with leaf damage. *Rice Sci.*, 20(6): 442–450.
- Reeson AF, Jankovic T, Kasper ML, Rogers S, Austin AD, 2003. Application of 16S rDNA-DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp *Vespula germanica*. *Insect Mol. Biol.*, 12(1): 85–91.
- Schloss PD, Delalibera I, Handelsman JO, Raffa KF, 2006. Bacteria associated with the guts of two wood-boring beetles: *Anoplophora glabripennis* and *Saperda vestita* (Cerambycidae). *Environ. Entomol.*, 35(3): 625–629.
- Warnecke F, Luginbuhl P, Ivanova N, Ghassemian M, Richardson TH, Stege JT, Cayouette M, McHardy AC, Djordjevic G, Aboushadi N, Sorek R, Tringe SG, Podar M, Martin HG, Kunin V, Dalevi D, Madejska J, Kirtan E, Platt D, Szeto E, Salamov A, Barry K, Mikhailova N, Kyrpides NC, Matson EG, Ottesen EA, Zhang X, Hernandez M, Murillo C, Acosta LG, Rigoutsos I, Tamayo G, Green BD, Chang C, Rubin EM, Mathur EJ, Robertson DE, Hugenholtz P, Leadbetter JR, 2007. Metagenomic and functional

- analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature*, 450(7169): 560–565.
- Xia XF, Zheng DD, Zhong HZ, Qin BC, Gurr GM, Vasseur L, Lin HL, Bai JL, He WY, You MS, 2013. DNA sequencing reveals the midgut microbiota of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and a possible relationship with insecticide resistance. *PLoS ONE*, 8(7): e68852.
- Xiang H, Huang YP, 2008. Symbiosis between gut microbiota and insects. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(5): 687–693. [相辉, 黄永平, 2008. 肠道微生物与昆虫的共生关系. 昆虫知识, 45(5): 687–693]
- Xu G, Sun ZL, Hu XL, Xue RY, Cao GL, Gong CL, 2015. Analysis on intestinal bacterial diversity in silkworm (*Bombyx mori*) based on 16S rRNA gene sequences. *Science of Sericulture*, 41(4): 641–649. [许刚, 孙振丽, 胡小龙, 薛任宇, 曹广力, 贡成良, 2015. 基于 16SrRNA 基因序列分析家蚕肠道细菌的多样性. 蚕业科学, 41(4): 641–649]
- Yang H, 2012. Diversity of Gut Bacteria in Larval of Four Lepidopteran Insect Species. MSc Thesis, Nanjing Agricultural University, Nanjing. [杨焯, 2012. 四种鳞翅目害虫肠道细菌多样性分析. 南京: 南京农业大学硕士学位论文]
- Yang YJ, Xu HX, Zheng XS, Tian JC, Lu YH, Lu ZX, 2015. Progresses in management technology of rice leafrollers in China. *Journal of Plant Protection*, 42(5): 691–701. [杨亚军, 徐红星, 郑许松, 田俊策, 鲁艳辉, 吕仲贤, 2015. 中国水稻纵卷叶螟防控技术进展. 植物保护学报, 42(5): 691–701]
- Yu HW, Wang ZK, Liu L, Xia YX, Cao YQ, Yin YP, 2008. Analysis of the intestinal microflora in *Hepialus gonggaensis* larvae using 16S rRNA sequences. *Curr. Microbiol.*, 56(4): 391–396.
- Zhang M, Yang P, Zhu JY, Yuan Y, Gui FR, Gao X, Wu GX, 2016. Analysis of the bacterial diversity in the intestine of larval *Procecidochares utilis* (Diptera: Trypetidae) based on 16S rDNA gene sequence. *Acta Entomologica Sinica*, 59(2): 200–208. [张某某, 杨璞, 朱家颖, 袁远, 桂富荣, 高熹, 吴国星, 2016. 基于 16S rDNA 基因序列的泽兰实蝇幼虫肠道细菌多样性分析. 昆虫学报, 59(2): 200–208.]
- Zhang S, Shao ZR, Li YP, Li Q, Xu L, Kang XX, Gao XW, 2014. Control efficacy of different pesticides on rice brown planthopper and rice leaf roller in the field. *Plant Protection*, 40(3): 191–194, 198. [张帅, 邵振润, 李永平, 李群, 徐蕾, 康晓霞, 高希武, 2014. 不同杀虫药剂对水稻“两迁”害虫田间药效研究. 植物保护, 40(3): 191–194, 198]
- Zhang XX, Geng JG, Lu ZQ, Liu WJ, 1980a. Studies on biological and ecological of *Cnaphalocrocis medinalis* Guenée. *Entomological Knowledge*, 17(6): 241–245. [张孝羲, 耿济国, 陆自强, 刘文娟, 1980a. 稻纵卷叶螟生物生态学特性研究初报. 昆虫知识, 17(6): 241–245]
- Zhang XX, Lu ZQ, Geng JG, Li GZ, Chen XL, Wu XW, 1980b. Studies on the migration of rice leaf roller *Cnaphalocrocis medinalis* Guenée. *Acta Entomologica Sinica*, 23(2): 130–139. [张孝羲, 陆自强, 耿济国, 李国柱, 陈学礼, 吴学文, 1980b. 稻纵卷叶螟迁飞途径的研究. 昆虫学报, 23(2): 130–139]
- Zhou HY, Sun B, Wu HL, Hu XM, Hao Y, Ye JM, 2015. Research progress on function of insects gut microbiota and the microbial of the *Bombyx mori*. *North Sericulture*, 36(4): 1–4, 33. [周洪英, 孙波, 吴洪丽, 胡兴明, 郝瑜, 叶建美, 2015. 昆虫肠道微生物功能及家蚕肠道微生物研究进展. 北方蚕业, 36(4): 1–4, 33]
- Zhu YC, Guo Z, Chen MS, Zhu KY, Liu XF, Scheffler B, 2011. Major putative pesticide receptors, detoxification enzymes, and transcriptional profile of the midgut of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 106(2): 296–307.

(责任编辑: 袁德成)